

## Badania nad karotenoidami u grzybów. II. Rodzaj *Amanita*

B. CZECZUGA

Zakład Biologii Ogólnej Akademii Medycznej w Białymstoku, ul. Kilińskiego 1

Czczuga B. (Laboratory of General Biology, Medical Academy, Kilińskiego 1, 15-230 Białystok). *Investigations on carotenoids in fungi. II. Genus Amanita*, Acta Mycol. 12 (2) : 265-272, 1976 (1977).

The author used column and thin layer chromatography to determine the occurrence and quantitative relationships of particular carotenoids in fruit-bodies of fungi of the genus *Amanita*. 8 species were examined.

40 carotenoids were found to be present, 32 of these were identified. Numerous carotenoids were demonstrated for the first in fungi.

### WSTĘP

Stwierdzone u grzybów karotenoidy w większości (Czczuga 1974) stanowią albo prowitaminę witaminy A, albo swoją aktywnością biologiczną przypominają ten związek biologicznie czynny (Bauerfeind 1972). Stąd uzasadnione ostatnio zainteresowanie występowaniem tych barwników w grzybach. Zawartość poszczególnych karotenoidów u różnych ich gatunków (Valadon, Mummery 1968) może być pomocna w badaniach taksonomicznych.

### MATERIAL I METODY

Zbadano owocniki *Amanita citrina* (Schaeff.) S. F. Gray, *A. muscaria* (L. ex Fr.) Hooker, *A. pantherina* (D.C. ex Fr.) Secr., *A. phalloides* (Vaill. ex Fr.) Secr., *A. rubescens* (Pers. ex Fr.) S. F. Gray, *A. spissa* (Fr.) Kummer, *A. vaginata* (Bull. ex Fr.) Quél., *A. verna* (Bull. ex Fr.) Pers. ex Vitt. zebrane w latach 1972-1973 w Puszczy Knyszyńsko-Białostockiej.

Zebrany materiał zalewano 95% acetonem w butelkach z ciemnego szkła i do chwili analizy przechowywano w lodówce w atmosferze azotu. Rozdziału poszczególnych barwników karotenoidowych dokonano dzięki chromatografii kolumnowej i cienkowarstwowej. Przedtem materiał pod-

dano hydrolizie w atmosferze azotu w temperaturze pokojowej w ciągu 24 godzin. Po hydrolizie ekstrakt puszczano na kolumnę wypełnioną  $Al_2O_3$ . Długość kolumn wahała się od 15 do 25 cm. Poszczególne frakcje eluowano używając do tego różnych układów rozpuszczalników (Czeczuga 1972). Następnie eluent odparowywano, a pozostałość po odparowaniu rozpuszczano w odpowiednim rozpuszczalniku celem wykreślenia krzywej absorpcji; maksima służyły między innymi do identyfikacji poszczególnych karotenoidów. Maksima absorpcji oznaczano posługując się spektrofotometrem Unicam oraz Specol.

Niezależnie od chromatografii kolumnowej uzyskany ekstrakt acetonowy rozdzielano na poszczególne pasma za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Posługiwano się płytkami szklanymi o wymiarach  $15 \times 40$  cm, które pokrywano silikazalem, następnie specjalną mikropipetą nanoszono ekstrakt acetonowy na linię startu, używając przy tym również różnych układów rozpuszczalników (Czeczuga 1972). Następnie ustalono wartość  $R_f$  wg powszechnie przyjętych zasad.

Identyfikację poszczególnych karotenoidów przeprowadzono na podstawie maksimum absorpcji poszczególnych frakcji, o wartości  $R_f$ , o<sup>1</sup> test epoksydowy, a także o uzyskane stosunki epifazy i hipofazy (Czeczuga 1974 a). Stosunki ilościowe poszczególnych karotenoidów oznaczano metodą Daviesa (Czeczuga 1974 a).

#### WYNIKI

Wykryto w badanych owocnikach grzybów 40 karotenoidów (tab. 1) (10 nie udało się zidentyfikować). Przedstawiono maksima absorpcji w różnych rozpuszczalnikach zidentyfikowanych i nie zidentyfikowanych karotenoidów oraz ich stosunki epi- i hipofazy (tab. 1). Zestawiono również występowanie poszczególnych karotenoidów oraz procentową ich zawartość w badanych gatunkach (tab. 2).

#### *Amanita citrina* (Schaeff.) S. F. Gray

Ustalono obecność ośmiu karotenoidów. Są to neurosporen, izokryptoksantyna, rubiksantyna, saproksantyna, izozeaksantyna, zeaksantyna, 1'-hydroksyspirilloksantyna oraz 1,2-1',2'-tetrahydro-1,1',dihydroksylikopen. Dominowały zeaksantyna stanowiąca 32,1% oraz 1'-hydroksyspirilloksantyna wynosząca 17,2% wszystkich karotenoidów stwierdzonych w owocnikach *A. citrina*.

#### *Amanita muscaria* (L. ex Fr.) Hooker

Analiza chromatograficzna wykazała obecność rodoksantyny, rodowibriny, 2-ketorodowibriny, estrowej formy aleuriaksantyny, fleksiksantyny,

Tabela 1 — Table 1

Maksyma absorpcji i współczynniki epi- i hipofazy wykrytych karotenoidów u badanych przedstawicieli *Amanita*

Maxima of absorption and coefficients of epi- and hypophase of detected carotenoids in the examined represent actives of *Amanita*

Nazwa karotenoidu Name of carotenoid	Rozpuszczalnik — Solvent				Współczynnik epi- i hipofazy Coefficient of epi- and hypophase
	eter naftowy ether	heksan hexane	etanol ethanol	benzen benzene	
1	2	3	4	5	6
$\beta$ -carotene	421, 451, 478				100 : 0
$\gamma$ -carotene	437, 461, 494				100 : 0
canthaxanthin		467			56 : 44
cryptoxanthin		425, 452, 480			86 : 14
neurosporene	414, 439, 466	416, 440, 470			100 : 0
neurosporaxanthin	450, 477, 505	440, 472, 505		460, 486, 515	100 : 0
$\beta$ -zeacarotene		440, 425, 450	427, 450		96 : 4
rhodopin-13-ol	442, 464, 493				14 : 86
isocryptoxanthin	447, 474				88 : 12
rhodoxanthin			496, 538		60 : 40
rhodovibrin	455, 485, 514				66 : 34
rhodopin		443, 470, 504			74 : 26
rubixanthin	438, 459, 488		435, 463, 496		80 : 20
torulene	460, 484, 518				100 : 0
torularhodin	467, 501, 537		463, 493, 529		50 : 50
flavoxanthin	421, 450	400, 420, 446	400, 421, 448		0 : 100
flexixanthin	483, 510				37 : 63
capsorubin				455, 485, 520	1 : 99
capsanthin		475, 504		458, 484, 515	4 : 96
zeaxanthin	424, 448, 475	425, 450, 480	425, 451, 482	440, 463, 492	11 : 89
isozeaxanthin	446, 473		451, 478		22 : 78
aleurixanthin	434, 460, 490				90 : 10
aleurixanthin ester	434, 462, 493				12 : 88
deoxyflexixanthin	477, 505		480		36 : 64
pectanixanthin	456, 482, 515				90 : 10
pectanixanthin ester	458, 484, 515				14 : 86
lycoxanthin	445, 475, 505				72 : 28
saproxanthin	445, 470, 500				22 : 78
2-keto-rhodovibrin	485, 511, 546				40 : 60
1'-hydroxy-spirilloxanthin	462, 492, 530				54 : 46

1	2	3	4	5	6
1,2-1'2'-tetrahydro-1,1'-dihydroksylikopenu					
4-keto-torulene	464, 492, 520		445, 470, 500	458, 485, 520	5 : 95
n-1				465, 505, 535	86 : 14
n-2			455, 505, 525		10 : 90
n-3				478, 495, 535	12 : 88
n-4	455, 505				8 : 92
n-5				455, 495, 545	30 : 70
n-6	435, 460, 478				0 : 100
n-7			445, 470, 525		40 : 60
n-8				485, 505	11 : 89
					14 : 86

kapsantyny, zeaksantyny oraz 1,2-1'2'-tetrahydro-1,1'-dihydroksylikopenu. W największej ilości wystąpiły 2-ketorodowibrina stanowiąca 27,9% wszystkich karotenoidów oraz zeaksantyna (24,6%), kapsantyna (15,4%), a także pochodny likopenu-1,2-1'2'-tetrahydro-1,1'-dihydroksylikopen (11,5%).

*Amanita pantherina* (D.C. ex Fr.) Secr.

Dominującym karotenoidem, podobnie jak w owocnikach *Amanita citrina*, okazała się również zeaksantyna stanowiąca 21,0% stwierdzonych karotenoidów. Do dalszych dominujących karotenoidów zaliczyć należy również kantaksantynę stanowiącą 16,8% wszystkich karotenoidów; 14,7% stanowiła aleuriaksantyna. Ponadto ustalono obecność jeszcze neurosporenu (10,1%), neurosporaksantyny (7,4%), likoksantyny (2,9%), 1'-hydroksyspirilloksantyny (5,5%) oraz deoksyfleksiksantyny (8,1%). Jednej frakcji, która w benzenie wykazała maksimum absorpcji w obrębie 465, 505, 535 nm, a stosunek epifazy do hipofazy jak 10:90, nie zidentyfikowano; karotenoid ten stanowił 13,5% stwierdzonych karotenoidów.

*Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Secr.

Analiza chromatograficzna wykazała obecność neurosporenu, fleksiksantyny, rodopiny 13-ol, izozeaksantyny, torularodiny oraz 1,2-1'2'-tetrahydro-1,1'-dihydroksylikopenu. Dwoch frakcji nie zidentyfikowano. Pierwsza w etanolu wykazała maksimum absorpcji w zakresie 455, 505 i 525 nm, współczynnik epi- i hipofazy 12:88; stanowiła ona 20,3% wszystkich karotenoidów. Druga frakcja w benzenie wykazała maksimum absorpcji w obrębie 478, 495, 435 nm, współczynnik epi- i hipofazowy jak

Tabela 2 — Table 2

Procentowa zawartość poszczególnych karotenoidów u badanych przedstawicieli  
*Amanita*

Per cent content of particular carotenoids in the examined representative of *Amanita*

Nazwa karotenoidów Name of carotenoids	Gatunki — Species							
	<i>A. citrina</i>	<i>A. muscaria</i>	<i>A. pantherina</i>	<i>A. phalloides</i>	<i>A. rubescens</i>	<i>A. spissa</i>	<i>A. vaginata</i>	<i>A. verna</i>
β-carotene								5,0
γ-carotene						14,4		
canthaxanthin			16,8		2,5			6,9
cryptoxanthin							7,6	
neurosporene	2,5		10,1	1,8			1,6	
neurosporaxanthin			7,4			44,2		29,6
β-zeacarotene						4,6		
rhodopin-13-ol				2,1				16,0
isocryptoxanthin	13,6							
rhodoxanthin		7,9						
rhodovibrin		2,9						
rhodopin							22,2	
rubixanthin	13,4						6,1	6,8
torulene								8,5
torularhodin				4,3				10,6
flavoxanthin					2,6			3,8
flexixanthin		2,4		15,2	4,8			
capsorubin					9,2			
capsanthin		15,4			38,8	12,0		
zeaxanthin	32,1	24,6	21,0		5,6		47,1	
isozeaxanthin	8,3			13,5		9,6	2,8	
aleurixanthin			14,7		19,1			
aleurixanthin ester		7,4						
deoxyflexixanthin			8,1					
plectanixanthin					2,3			
plectanixanthin ester					1,0			
lycoxanthin			2,9					
saproxanthin	2,5							
2-ketorhodovibrin		27,9						
1'-hydroxyspirilloxanthin	17,2		5,5					5,7
1,2-1'2'-tetrahydro-1,1'di- hydroxylycopene	10,4	11,5		5,9				
4-ketotorulene						15,2		
n — 1			13,5					
n — 2				29,3				
n — 3				27,2				
n — 4					11,1			
n — 5					3,0			
n — 6							2,4	
n — 7							10,2	
n — 8								16,2

8:92. Zawartość tej frakcji w badanym materiale wynosiła 27,9%. Ze zidentyfikowanych karotenoidów największy procent stanowiły fleksi-ksantyna (15,2%) oraz izozeaksantyna (13,5%).

*Amanita rubescens* (Pers. ex Fr.) S. F. Gray

Acetonowy ekstrakt rozdzielono na dziesięć frakcji, z których dwóch nie zidentyfikowano. Stwierdzono obecność kantaksantyny, kapsorubinu, kapsantynu, aleuriaksantyny, plektaniaksantyny, flawoksyantyny, fleksi-ksantyny oraz zeaksantyny. Pierwszej frakcji nie zidentyfikowano; w eterze naftowym jako rozpuszczalnik wykazała ona maksimum absorpcji w zakresie 455 i 505 nm, współczynnik epi- i hipofazy jak 30:70. Natomiast druga nie zidentyfikowana frakcja w benzenie jako rozpuszczalnik miała maksimum absorpcji w obrębie 455, 495 i 545 nm mając hipofazowy charakter. Pod względem ilościowym dominującym karotenoidem okazała się kapsantyna (38,8%) oraz aleuriaksantyna (19,1%).

*Amanita spissa* (Fr.) Kummer

Ustalono obecność następujących karotenoidów:  $\gamma$ -karotenu,  $\beta$ -zeakarotenu, neurosporaksantyny, kapsantyny, 4-keto-torulenu oraz izozeaksantyny. Za dominujące karotenoidy należy uznać neurosporaksantyn (44,2%), 4-keto-torulen (15,2%),  $\gamma$ -karoten (14,4%), a także kapsantynę (12,0%).

*Amanita vaginata* (Bull. ex Fr.) Quél.

Z ośmiu wyodrębnionych frakcji zidentyfikowano sześć, wśród których wyodrębniono kryptoksyantynę, neurosporen, rubiaksantynę, rodopin, zeaksantynę oraz izozeaksantynę. Dominującymi karotenoidami okazały się w badanym materiale: zeaksantyna stanowiąca 47,1% oraz rodopin wynoszący 22,2% wykrytych karotenoidów. Nie zidentyfikowane karotenoidy stanowiły razem 12,6% wszystkich karotenoidów.

*Amanita verna* (Bull. ex Fr.) Pers. ex Vitt.

Stosując chromatografię kolumnową acetonowy ekstrakt z owocników *Amanita verna* rozdzielono na 9 frakcji. Dwoch frakcji nie zidentyfikowano. Wyodrębniono natomiast takie karotenoidy jak  $\beta$ -karoten, kantaksantynę, neurosporaksantynę, torulen, torularodynę, rubiaksantynę, flawoksyantynę, rodopin-13-ol, zeaksantynę oraz 1'-hydroksyspirilloksantynę. Spośród zidentyfikowanych karotenoidów do dominujących zaliczyć należy neurosporaksantynę (29,6%), rodopin-13-ol (16,0%) oraz zeaksantynę (15,4%).

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

Liczne karotenoidy stwierdzone w owocnikach badanych gatunków grzybów z rodzaju *Amanita* były już nieraz wykazywane u innych gatunków grzybów (Czeczuga 1974). Są to:  $\beta$ -karoten,  $\gamma$ -karoten, torulen, neurosporen, neurosporaksantyna, lykoksantyna oraz rodopin. W latach sześćdziesiątych w owocnikach *Aleuria aurantia* ustalono obecność nowego karotenoidu, który został nazwany aleuriaksantyną (Liaaen-Jensen 1965). Karotenoid ten wystąpił również w owocnikach *Amanita muscaria*, *A. pantherina* oraz *A. rubescens*. Dotyczy to również plektaniaksantyny, karotenoidu stwierdzonego po raz pierwszy w owocnikach *Plectania coccinea* (Arpin, Liaaen-Jensen 1967). W naszym materiale karotenoid ten znaleziono w owocnikach *Amanita rubescens*. Ponadto niektóre karotenoidy stwierdzone w owocnikach niektórych gatunków *Amanita* były już wykazywane przez nielicznych badaczy. O występowaniu u niektórych grzybów rubiksantyny donosili Valadon i Mummy (1968). Obecność rodoksantyny i torularodiny w micelach *Epicoccum nigrum* wykazali Foppen i Gribanowski-Sassu (1968). Na szczególne podkreślenie zasługuje stwierdzenie występowania takich karotenoidów jak: kantaksantyna, kryptoksantyna oraz zeaksantyna. Otóż kantaksantyna po raz pierwszy była opisana przez Haxo (1950) w owocnikach *Cantharellus cinnabarinus* jako karotenoid dominujący. W naszym materiale kantaksantynę stwierdzono w owocnikach *Amanita pantherina*, *A. rubescens*, oraz *A. verna*. A w owocnikach *Amanita pantherina* karotenoid ten był jednym z dominujących stanowiąc 16,8% wszystkich karotenoidów. Kryptoksantyna i zeaksantyna (Goodwin 1963) należą do karotenoidów bardzo rzadko występujących u grzybów. W owocnikach badanych gatunków z rodzaju *Amanita* kryptoksantyna lub jej pochodna izokryptoksantyna stwierdzone zostały w owocnikach *A. citrina* (izokryptoksantyna) oraz *A. vaginata*. Kryptoksantyna wykazana była przez Turian (1960) u *Calocera viscosa*. Jeżeli chodzi o zeaksantynę to ani jej pochodnej — izozeaksantyny, nie stwierdzono jedynie w owocnikach *Amanita verna*. W siedmiu przypadkach zeaksantyna lub izozeaksantyna należały do dominujących karotenoidów. W owocnikach np. *Amanita vaginata* zeaksantyna stanowiła 47,1% wszystkich karotenoidów.

Takie karotenoidy natomiast jak rodowibrina, flawoksantyna, fleksiksantyna, kapsorubina, kapsantyna, deoksyfleksiksantyna, saproksantyna, 2-keterodowibrina, 4-keto-torulen, 1'-hydroksyspirilloksantyna oraz 1,2-1'2'-tetrahydro-1,1'-dihydroksylikopen po raz pierwszy zostały stwierdzone u grzybów i niektóre z nich stanowiły pokaźne ilości. Rodowibrinę znaleziono w owocnikach *Amanita muscaria*; w owocnikach tego muchomora stwierdzono również obecność 2-keterodowibriny, która należy do dominujących karotenoidów (27,8%). Jeżeli chodzi o flawoksantynę, to

wykryto ją w owocnikach *Amanita rubescens* oraz *A. verna*. Natomiast taki karotenoid jak fleksiksantyna stwierdzono w owocnikach *Amanita muscaria*, *A. phalloides* oraz *A. rubescens*, a deoksyfleksiksantynę — w owocnikach *A. pantherina*. Kapsorubinę wykryto w owocnikach *Amanita rubescens*. W większej ilości gatunków stwierdzono kapsantynę. Do gatunków tych należą *Amanita muscaria*, *A. rubescens* oraz *A. spissa*. A w owocnikach *Amanita rubescens* kapsantyna należy do dominujących karotenoidów. Natomiast saproksantyna, stwierdzona tylko w owocnikach *Amanita citrina*, stanowiła jedynie 2,5%. Podobnie 4-ketotorulen stwierdzono jedynie w owocnikach *Amanita spissa*; należał on do karotenoidów dominujących stanowiąc 15,2% wszystkich karotenoidów. Jeśli chodzi o 1'-hydrokspirilloksantynę, to stwierdzono ją w owocnikach 5 gatunków; w owocnikach *Amanita citrina* należała ona do karotenoidów dominujących (17,0%). W owocnikach czterech gatunków z rodzaju *Amanita* stwierdzono obecność 1,2-1'2'-tetrahydro-1'1'-dihydroksylikopenu.

Badania karotenoidów w owocnikach gatunków z rodzaju *Amanita*, jak wynika z przytoczonych danych, wykazały zarówno różnice jakościowe, jak i ilościowe poszczególnych karotenoidów. Może to mieć istotne znaczenie z punktu widzenia taksonomicznego, na co zwracają uwagę niektórzy autorzy (Arpin, Liaaen-Jensen 1967; Valadon, Mummery 1968).

#### LITERATURA

- Arpin N., Liaaen-Jensen S., 1967, Recherches chimiotaxinomiques sur les champignons. Fungal carotenoids. III. Phytochem. 6: 995-1005.
- Bauernfeind J. C., 1972, Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods feeds, J. Agr. Food. Chem. 20: 456-473.
- Czczuga B., 1972, Carotenoid pigments in the *Bryum ventricosum* Dicks 1785 form the Pletvicki Lakes (Yugoslavia). Plant (Berl.) 103: 87-90.
- Czczuga B., 1974, Badania nad karotenoidami u grzybów. Wiadomości Botaniczne 18: 85-89.
- Czczuga B., 1974 a, Carotenoids in *Euglena rubida* Mainx, Comp. Biochem. Physiol. 48 B: 349-354.
- Foppen F. H. and Gribanowski-Sassu O., 1968, Lipids produced by *Epicoccum nigrum* in submerged culture, Biochem. J. 106: 97-100.
- Goodwin T. W., 1963, Biochemistry of Industrial Microorganismus. Acad. Press. London.
- Haxo F., 1950, Carotenoids of the mushroom *Cantharellus cinnabarinus*, Bot. Gazet. 112: 228-232.
- Liaaen-Jensen S., 1965, On fungal carotenoids and the natural distribution of spirilloxanthin, Phytochem.: 925-931.
- Turian G., 1960, Identification des carotenoids majeurs de quelques champignons *Ascomycetes* et *Basidiomycetes*. Arch. Mikrobiol. 36: 130-146.
- Valadon L. R. G. and Mummery R. S., 1968, Taxonomic significance of carotenoids, Nature 217: 1066.